

# 一株红色素产生菌 H2 的初步鉴定

赵昌会

(湖南科技学院,湖南 永州 425100)

**摘要:**从海泥中分离纯化得到 1 株产红色素细菌,对该菌进行生理生化分析和 16S rDNA 鉴定。结果表明:该菌为革兰氏阴性,  $H_2S$ 、V.P.、酶触及明胶液化试验呈阳性,可在 4~37℃ 下生长。可利用的碳源有麦芽糖、纤维二糖、甘油、D-葡萄糖、D-果糖、海藻糖、蔗糖及 D-甘露醇等,可利用的氮源有蛋白胨、酵母膏和牛肉膏等; 16S rDNA 鉴定为 *Serratia marcescens*,并建立了 H2 系统发育树。

**关键词:**红色素;鉴定;生理生化特性

**中图分类号:**Q93-3

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2012)02-0090-03

色素已广泛地应用于食品、印染、化妆品、医药、塑料和颜料等方面,它主要包括合成色素和天然色素。在饮料、食品、医药和化妆品等行业,由于合成色素对人体有一定的毒性,有的还可能致癌,而微生物来源的天然色素具有安全可靠、营养价值高、种类繁多、成本低和产品质量易控制等特性,因此越来越受到人们的青睐<sup>[1]</sup>。近年来发现灵菌色素具有抗菌活性、免疫抑制及诱导肿瘤细胞凋亡等机制,引起研究者的极大关注。产灵菌红素的微生物<sup>[2-3]</sup>有沙雷氏菌属、假单胞菌属、弧菌属、交替单胞菌属、皱纹单胞菌属及放线菌等。该试验研究了一株红细菌的生理生化及分子生物学特性,旨在为开发海洋微生物生产红色素奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试泥样于 2010 年 8 月,采集于厦门船坞(退潮后 0~3 cm)。

### 1.2 分离培养基

将 2216E:蛋白胨 5.0 g,酵母提取物 1.0 g,  $FePO_4 \cdot H_2O$  0.01 g、LB 培养基:蛋白胨 10 g, NaCl 10 g,酵母膏 5 g、Tyr 培养基:葡萄糖 1 g,蛋白胨 5 g,NaCl 5 g, $CaCl_2$  0.1 g,L-酪氨酸 2 g 培养基分别加琼脂 15 g 及人工海水和蒸馏水各 500 mL 配置而成,pH 自然。将供试样品稀释后分别涂布在 2216E、LB 和 Tyr 培养基上,经 28℃ 倒置培养

48 h,将呈红色的菌落分别接种于 Tyr 发酵培养基中培养,48 h 后挑选 1 株生长好、颜色鲜红的菌株进行纯化,编号为 H2,即为试验菌株。

### 1.3 生理生化试验

参照《微生物学实验》<sup>[4]</sup>及文献<sup>[5]</sup>相关内容,其中对待测碳氮源灭菌采用乙醚法<sup>[6]</sup>、滤膜(直径 0.22  $\mu m$ )过滤除菌及紫外线灭菌<sup>[7]</sup>。

### 1.4 细菌 16S rDNA 的扩增

细菌基因组 DNA 的提取参考文献<sup>[8]</sup>并加以改进,PCR 扩增的通用引物:27F(5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3'),1492R(5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应条件:95℃ 5 min,94℃ 40 s,56℃ 40 s,72℃ 2 min,30 循环,72℃ 10 min。PCR 产物经检测、纯化后送上海美吉生物技术有限公司测序。

### 1.5 系统发育树的构建

测序结果经 Chromas v1 分析拼接,于数据库 EzTaxon Server version2.1 和 EMBL 中对菌株的 16S rDNA 序列进行同源比较,应用 DNA-MAN(Version 6.0)对序列对比结果及近缘模式种的序列进行缺省参数的对位排列,然后用 MEGA 4.0 软件包采用 Neighbor-joining 算法 1 000 次重复构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的生理生化特性

菌株 H2 呈革兰氏阴性,具有较强的过氧化氢酶活性, $H_2S$ 、V.P.、酶触及明胶液化试验呈阳性。菌落形态较小,呈红色,圆形,突起,光滑,易挑取。H2 菌株于 Tyr 培养基中培养,生长温度

收稿日期:2011-09-19

基金项目:2010 年湖南科技学院校级青年基金资助项目

作者简介:赵昌会(1980-),男,陕西省洛南县人,硕士,讲师,从事微生物教学及研究。E-mail:zchui112@163.com。

在 4~37℃,39℃ 及以上生长受到抑制。可利用果糖、海藻糖、蔗糖及 D-甘露醇等,可利用的氮源的碳源有麦芽糖、纤维二糖、甘油、D-葡萄糖、D-有蛋白胨、酵母膏和牛肉膏等(见表 1)。

表 1 菌株 H2 对不同碳氮源的利用

Table 1 Utilization of different carbon and nitrogen sources by strain H2

D-葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	纤维二糖	甘油	D-甘露醇	淀粉	D-果糖	海藻糖
++	++	++	++	++	+	+	+	+
乳糖	棉子糖	柠檬酸	蛋白胨	酵母膏	牛肉膏	L-His	NaNO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
+	-	-	++	++	++	+	-	+

注:++:生长良好;+:生长;-:不生长,对照(不添加碳源或氮源)不生长。  
Note:++:growth well;+:growth;-:not growth;control groups(not add carbon or nitrogen source)not growth.

2.2 16S rDNA 的序列测定结果 得到 1 385 bp,结果见图 1。

扩增产物纯化后送出测序,返回结果经拼接

```
1  GGTAGCACAAGGGAGCTTGCTCCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGG
61  GAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCG
121  CAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAG
181  CTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
241  CAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
301  TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTT
361  GTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTTAATACGTTTCATCAATTGACGTTA
421  CTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAA
481  GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGA
541  AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGG
601  GGGGTAGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCG
661  AAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
721  TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGG
781  CGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
841  AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGC
901  AACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGC
961  CTTCCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
1021  GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGCCGGGAAC
1081  TCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGG
1141  CCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGC
1201  GAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC
1261  CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGG
1321  CCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAA
1381  CCTTC
```

图 1 16S rDNA 序列  
Fig. 1 16S rDNA sequence

2.3 系统发育树的构建

将菌株的 16S rDNA 序列输入到 EzTaxon Server version2.1 数据库中比较分析,结果与 *S. marcescens* subsp. *Sakuensis* 的相似性为 99.856%,在 NCBI 比对中与 *S. marcescens* R9-8A、*Serratia* sp. YF-2 及 *S. marcescens* MH6 相似度为 100%,可确定 H2 为 *S. marcescens*,系统发育树(见图 2)。

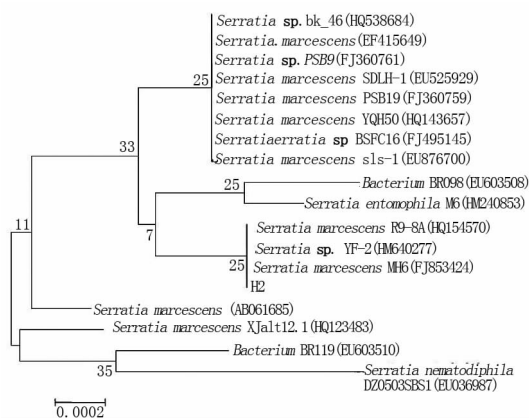


图2 菌株 H2 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain H2

### 3 结论与讨论

该研究选用从海泥中分离纯化得到的确 1 株产红色素进行生理生化分析和 16S rDNA 鉴定。结果表明,该菌为革兰氏阴性,  $H_2S$ 、VP、酶触及明胶液化试验呈阳性,可在  $4\sim 37^\circ C$  下生长。可利用的碳源有麦芽糖、D-葡萄糖、D-果糖、海藻糖、蔗糖及 D-甘露醇等,可利用的资源有蛋白胨、酵母膏和牛肉膏等;16S rDNA 鉴定其为 *Serratia marcescens*,并建立了 H2 系统发育树。利用微生物生产灵菌红素具有独特的优势,黑色素的微生物种类多,繁殖快,容易大规模培养,具有广阔的发展前景。海洋的生态环境独特,蕴含着丰富的微生物资源,从海洋中筛选产生色素的微生物具有重要意义。仅有少数沙雷氏菌在好氧条件下产灵菌红素,受菌种、培养基及培养条件等的影响较大,对该菌株产灵菌红素的条件有待进一步研究。此外,经过氧化氢酶试验发现 H2 菌株

具有较强的过氧化氢酶活性,而过氧化氢酶广泛应用于食品消毒、临床分析、医学诊断及纺织、造纸等工业<sup>[9]</sup>,可进一步研究其发酵产生过氧化氢酶的情况,评价其开发潜力。此外,在碳源利用的试验中,可采用紫外线对碳源灭菌,不仅操作方便,且和乙醚灭菌的效果相同,比滤膜过滤的效果要好,因此一般可采用紫外线灭菌。产  $H_2S$  试验可采用滤纸条法,而非直接将醋酸铅加到培养基中,它可能会抑制某些微生物的生长,影响结果的准确性。

#### 参考文献:

- [1] 马诚,张文学,苏燕娇,等.一株产红色素酵母菌的初步鉴定及色素提取工艺探究[J].食品工业科技,2008,29(1):90-92.
- [2] 郝名慧,楼志华,张梁,等.一株新粘质沙雷氏菌发酵产红色素及其结构的研究[J].天然产物研究与开发,2007,19(3):436-442.
- [3] A Khanafari, M Mazaheri Assadi, F Ahmadi Fakhr. Review of Prodigiosin, Pigmentation in *Serratia marcescens* [J]. Online J. Biol. Sci., 2006, 6(1): 1-13.
- [4] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2004.
- [5] John D Buck. Nonstaining(KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria[J]. Applied and environmental microbiology, 1982, 10: 992-993.
- [6] Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340.
- [7] 张祝兰,唐文力,杨煌建,等. UV 与 NTG 复合诱变选育咪唑立宾高产菌[J].微生物学通报,2010,37(6):857-860.
- [8] 张颖慧,魏东盛,邢来君,等.一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法[J].微生物学通报,2008,35(3):466-469.
- [9] 方芳,李寅,堵国成,等.一株嗜热子囊菌产生的碱性耐热过氧化氢酶及其应用潜力[J].生物工程学报,2004,20(3):423-428.

## Preliminary Identification of A Strain H2 Producing Red Pigments

ZHAO Chang-hui

(Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou, Hunan 425100)

**Abstract:** A bacterial strain producing red pigments was isolated from marine mud, its biochemical and physiological characteristics, 16S rDNA sequence were investigated. The result showed that the strain was Gram negative, could produce  $H_2S$ , 2,3-butanediol, peroxidase, gelatinase, the growth temperature was  $4\sim 37^\circ C$ . It could use maltose, cellobiose, glycerol, D-glucose, D-fructose, trehalose, sucrose, D-mannitol etc. as carbon resource, and could use peptone, yeast extract and beef extract as nitrogen resource. The strain H2 was identified as *Serratia marcescens* by 16S rDNA, and phylogenetic trees were constructed by neighbor joining.

**Key words:** red pigment; identification; physiological and chemical characteristics